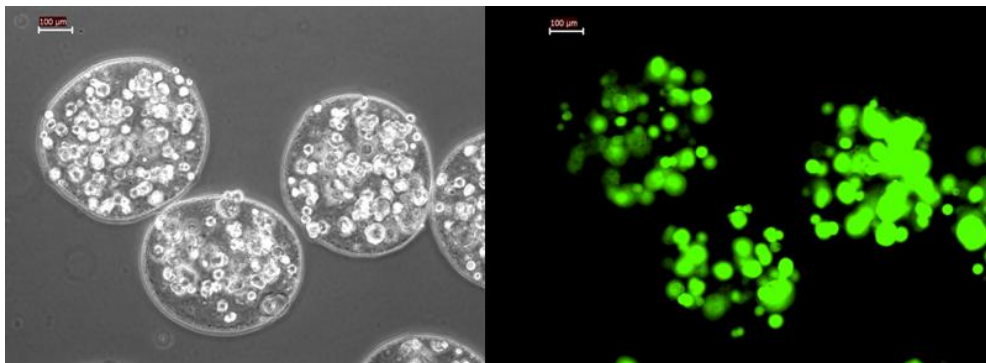
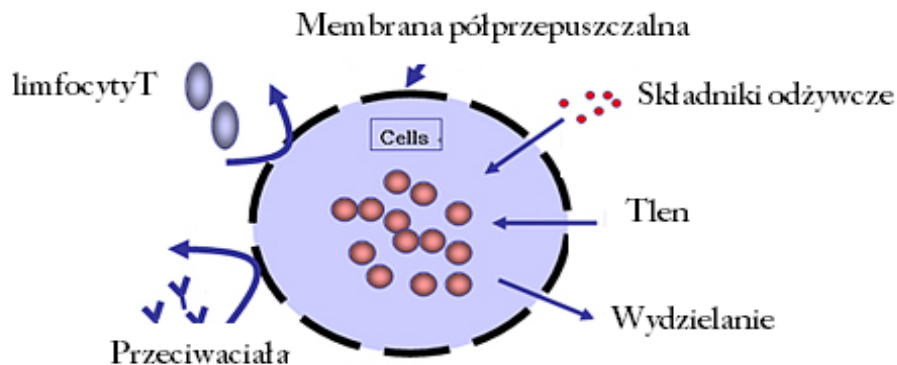


## Enkapsulacja komórek w mikrosferach

### Wstęp teoretyczny:

Enkapsulacja- immobilizacja komórek w materiale biopolimerowym posiadającym cechy półprzepuszczalnej membrany, która z jednej strony pozwala na swobodną dyfuzję metabolitów do wnętrza kapsułki oraz produktów metabolizmu na zewnątrz kapsułki, a z drugiej strony zapewnia immunoizolację- blokuje dostęp białek układu odpornościowego do enkapsulowanych komórek. Jest to obiecująca metoda inżynierii tkankowej ze względu na brak konieczności stosowania po przeszczepie leków immunosupresyjnych. Ponadto środowisko wewnątrz kapsułki doskonale naśladuje trójwymiarową macierz zewnątrzkomórkową oraz umożliwia przestrzenny kontakt komórka- komórka.

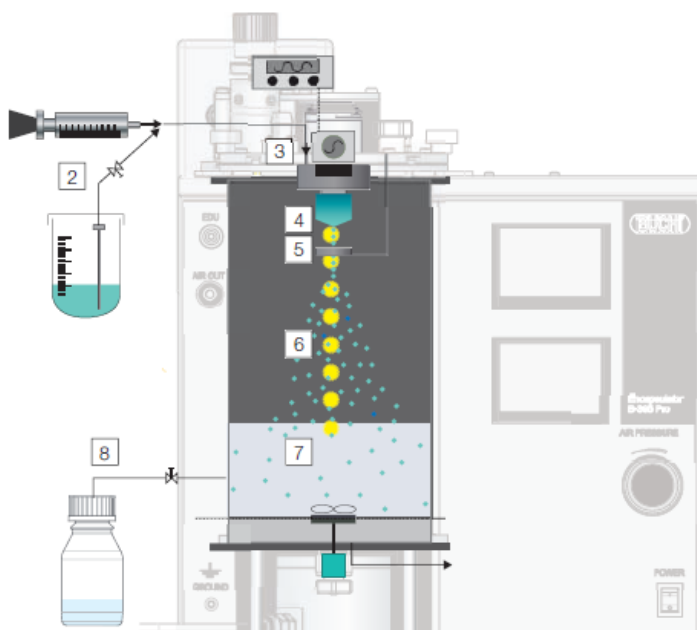


Mikrosfery wytwarzane są przy użyciu enkapsulatora, w którym laminarny przepływ roztworu alginianu przez dyszę o danym rozmiarze zakłócony jest wibracjami, co przy optymalnej częstotliwości drgań opisanej przez Webera (Równanie 1) prowadzi do podziału strumienia na krople, którym następnie nadawany jest za pomocą elektrody jednoimienny ładunek elektrostatyczny, co zapobiega łączeniu się kropeł (Rys. 1). Krople roztworu alginianu wpadają następnie do roztworu polimeryzującego (roztworu chlorku wapnia), gdzie

następuje ich utwardzanie i utrwalanie. Aparatura umożliwia produkcję mikrosfer o rozmiarach od 0,15 mm do 2 mm, także w warunkach sterylnych. Proces charakteryzuje duża produktywność (do 6000 mikrosfer na sekundę) i powtarzalność (w optymalnych warunkach odchylenie standardowe od średnic produkowanych mikrosfer to ok. 5%), gdyż możliwa jest kontrola wszystkich parametrów procesu (natężenie przepływu roztworu alginianu, rozmiar dyszy, częstotliwość drgań, napięcie elektrody).

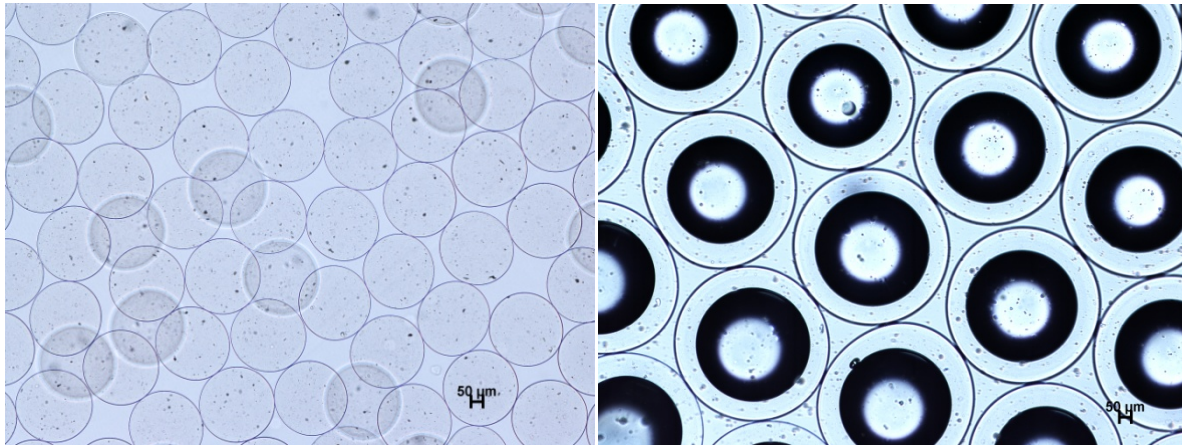
$$\lambda_{opt} = \pi\sqrt{2}D \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma D}}} \quad (1)$$

gdzie: D- średnica dyszy [m],  $\eta$ - lepkość dynamiczna [Pa s],  $\rho$ - gęstość [kg/m<sup>3</sup>],  $\sigma$ - napięcie powierzchniowe [N/m].



Rysunek 1. Schemat aparatury do enkapsulacji, 2- podawanie roztworu alginianu, 3- jednostka wibrująca, 4- dysza, 5- elektroda, 6- rozdzielone krople, 7- polimeryzacja i utrwalanie mikrosfer

Przy użyciu dyszy koncentrycznej możliwa jest również produkcja kapsułek typu core- shell o ściśle określonych rozmiarach (Rys. 2).



Rysunek 2. Zdjęcia przedstawiające przykłady wytwarzanych mikrosfer (z lewej) o średnicy  $324,08 \pm 3,85 \mu\text{m}$  oraz kapsulek (z prawej) o średnicy wewnętrznej  $462,99 \pm 12,95 \mu\text{m}$  oraz średnicy zewnętrznej  $649,78 \pm 11,16 \mu\text{m}$ .

### Wykonanie ćwiczenia:

#### Przygotowanie komórek MG63

#### **Materiały:**

- PBS Phosphate Buffered Saline bezwapniowy
- 0,25% Trypsyna-EDTA
- pożywka hodowlana (DMEM, 10% FBS, 1% L-glutaminy, 1% Pen-Strep)
- sterylny 1,5% roztwór alginianu sodu w PBS pH=7,4, ok. 20 ml
- sterylna strzykawka 50 ml z luer-lock

#### **Sprzęt:**

- pipety serologiczne
- łaźnia wodna (37°C)
- 15 ml i 50 ml falkony
- odwrócony mikroskop optyczny
- zlewka
- urządzenie do liczenia komórek Scepter

1. Ogrzać odczynniki w łaźni wodnej.
2. Skontrolować stan komórek pod mikroskopem.
3. Przenieść butelki z łaźni wodnej pod komorę laminarną (spryskać 70% etanolem).
4. Umieścić butelkę z komórkami pod komorą laminarną.
5. Usunąć pożywkę hodowlaną za pomocą pipety serologicznej.
6. Przebrać komórki 10 ml PBS (unikając lania płynu bezpośrednio na powierzchnię komórek).
7. Usunąć PBS, dodać 2 ml trypsyny bezpośrednio na komórki.

8. Inkubować komórki z trypsyną 4 min w inkubatorze.
9. Skontrolować wygląd komórek pod mikroskopem.
10. Jeśli ok. 90% komórek jest okrągła i pływa w pożywce dodać 8 ml pożywki w celu dezaktywacji trypsyny.
11. Przepuścić zawiesinę komórek 10 razy przez koniec pipety dociskając go do rogu butelki.
12. Przenieść zawiesinę komórek do 15 ml falkonu.
13. Pobrać 200  $\mu$ l zawiesiny do eppendorfa.
14. Wirować komórki przez 5 min przy 200g.
15. Policzyc komórki używając próbki w eppendorfie.
16. Po zwirowaniu komórek zawiesić je w sterylnym r-rze alginianu w ilości  $10^6$ /ml.
17. Przenieść zawiesinę do sterylnej 50 ml strzykawki z luer-lockiem

### Enkapsulacja

#### **Materiały:**

- roztwór polimeryzujący (100mM  $\text{CaCl}_2$ ), 1L
- roztwór płuczący (0,9% NaCl+ 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ), 1L

#### **Sprzęt:**

- lejek
- cylinder 100 ml
- enkapsulator

18. Umieścić pożywkę w łaźni wodnej o temp. 37°C.
19. Umieścić komorę do pracy sterylnej enkapsulatora pod komorą laminarną.
20. Podłączyć strzykawkę z zawiesiną komórek w alginianie do jednostki produkującej mikrosfery.
21. Wlać przy użyciu lejka roztwór polimeryzujący (ok. 400 ml) do komory sterylnej enkapsulatora przez otwór z filtrem płynów (zdjąć uprzednio filtr).
22. Podłączyć komorę do pracy sterylnej do enkapsulatora.
23. Ustawić parametry: **F= 800 Hz, f=4,5 ml/min, U= 1600 V, A=5**
24. Zbierać mikrosfery do by-passu przez kilka sekund do momentu stabilizacji warunków.
25. Odsunąć by-pass, produkować mikrosfery przez kilka minut.
26. Powrócić na by-pass, wyłączyć przepływ i drgania.
27. Mieszać mikrosfery przez ok. 5 min w celu utwardzenia.
28. Pod komorą laminarną złąć r-r polimeryzujący (nie do końca, mikrosfery muszą być nim delikatnie pokryte).
29. Dodać r-r płuczący (ok. 300 ml) i mieszać kilka minut.
30. Złąć r-r płuczący i dodać jego kolejną porcję.
31. Złąć część r-ru płuczącego, resztę przenieść do butelki podłączonej do komory.
32. Odłączyć butelkę od komory, poczekać aż wszystkie mikrosfery zsedymetują.

33. Zlać część roztworu płuczącego z nad mikrosfer, przenieść zawiesinę mikrosfer do sterylne go cylindra i sprawdzić objętość mikrosfer (poczekać aż zsedymetują).
34. Zlać r-r płuczający, zawiesić mikrosfery w ogrzanej pożywce w ilości 1ml mikrosfer/3 ml pożywki.
35. Przenieść zawiesinę mikrosfer na szalki Petriego o średnicy 5 cm w ilości 4 ml zawiesiny/szalkę.
36. Skontrolować obecność komórek i jakość mikrosfer pod mikroskopem optycznym.
37. Umyć i wysterylizować sprzęt.

#### **Sprawozdanie:**

1. Obliczyć optymalną długość fali drgań, pozwalającą na produkcję jednorodnych mikrosfer dla dyszy o średnicy 200  $\mu\text{m}$  i roztworu alginianu sodu o stężeniu 1,5%.
2. Opisać metody sterylizacji cieczy o różnej lepkości (także wysokiej) oraz cieczy wrażliwych na wysoką temperaturę.
3. Do czego można użyć enkapsulowanych komórek?

#### **Zagadnienia do wejściówki:**

- Treść instrukcji do ćwiczeń
- Publikacja Hasan Uludag , Paul De Vos , Patrick A. Tresco, Technology of mammalian cell encapsulation, Advanced Drug Delivery Reviews 42 (2000) 29–64, punkty: 2.1., 5.1., 5.3.